

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Génie Biologique



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Criblage d'enzymes d'intérêt
biotechnologique produites par des
souches halophiles locales*

Présenté par

BENHAMOUCHE Naouel

et

MESSADI Hamida

Soutenu le : **21 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mr NOURI

MCB

Président

Mme ARKOUB

MCB

Examinatrice

Mme YAHIAOUI H.

MAA

Promotrice

Promotion 2016/2017

Remerciements

*Nous sommes reconnaissantes envers **Dieu** le créateur le tout-puissant de nous avoir donné la sagesse, le courage nous le remercions car il a mis à notre disposition des gens qu'il nous encourage et soutenu pour accomplir cette tâche*

Nous remercions le président de jury M. NOURI d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à M^{me} Arkoub d'avoir accepté d'examiner notre travail de fin d'étude.

*Nos sincères gratitude vont également à M^{me} **Yahiaoui** pour son aide, sa patience, son soutien et ses précieux conseils qui nous ont permis de réaliser ce travail.*

A tout le personnel du laboratoire génie biologique

Dédicace

*je dédie ce travail à la mémoire de mon cher père et ma chère mère
J'espère que, du monde où ils sont est sien maintenant, ils apprécient
cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une
fille qui a toujours priée pour le salut de leur âme. Puisse Dieu, le
tout*

Puissant, leur accorde sa sainte miséricorde !

*Je tiens à présenter mes reconnaissances et mes remerciements à mon
mari Riad. Qui n'a jamais cessé de me soutenir pour que je puisse
finir mes études et avoir une bonne formation et à qui je voudrais
exprimer mes affections et mes gratitude.*

A Mes très chers frères, sœurs pour leur affection, compréhension et

Patience

Et A toute ma famille ainsi mes amie

A ma collègue Hamida pour Sa collaboration efficace.

*A tous ceux qui ont une relation de prêt ou de loin avec la réalisation
du présent rapport. Pour terminer je tiens à remercier notre
encadreur« M^{me} **Yahiaoui**» pour son aide et son soutien durant toute
l'année*

Naouel

Dédicace

*Je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé de près ou de loin
pour que je puisse arriver à ce stade.*

*A ma chère mère pour son soutien moral et matériel durant toutes mes
années d'études que Dieu le tout-puissant la protège, A la mémoire de
mon chers père, Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte
miséricorde.*

A ce qui ma donné joie, bonheur et amour, mon fiancé Hassen

*Mes très chers frères, sœurs pour leur affection, compréhension et
patience*

A toute ma grande famille.

A mes amies surtout yasmine

A mes amies de l'université.

A ma collègue Naouel pour Sa collaboration efficace.

*Pour terminer je tiends à remercier notre encadreur « M^{me} Yahiaoui »
pour son aide et son soutien durant toute l'année.*

Hamida

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : les microorganismes halophiles.....1

I- Les environnements hypersalins.....1

II- les archées halophiles extrêmes.....4

1- Définition4

2- Caractères généraux.....4

2-1- La déférence entre les halotolérants et les halophiles.....4

2-2- Les halovirus.....4

2-3- L'intérêt des archées halophiles.....5

Chapitre II : Métabolites produite-par les halophiles extrêmes..... 6

I- Les enzymes produites.....6

1- Les protéases6

2- Les amylases.7

3- Les lipases et estérases.....7

4- Les xylanases.....7

5- Les cellulases.....7

6- Les nucléases H.....7

7- Intérêt des enzymes halophiles.....7

II- Autres composés.....8

1- Production des corps dissous compatibles9

2- Production d'exo polysaccharides	10
3- Production des pigments et antibiotiques.....	10

Partie II : Matériel et méthodes

I. Matériel biologique.....	11
II. Méthode.....	11
II-1- La mise en culture des souches (Revivification).....	11
II-2- La mise en évidence des activités enzymatiques.....	12
II-3- Etudes de la stabilité thermique des enzymes.....	13
II-4- Effet des solvants organique sur l'activité enzymatique	14

Partie III : Résultats et discussion

III -1- Mise en culture des souches (revivification).....	15
III -2- La mise en évidence des activités enzymatiques.....	16
III -3- Etudes de la stabilité thermique des enzymes	21
III -4- Effet des solvants organique sur l'activité enzymatique.....	23
III -5- Discussion.....	27

- Conclusion

- Références bibliographiques

- Annexes

Liste des figures

Numéro De la Figure	Titre de la figure	page
1	Arbre phylogénique des êtres vivants	3
2	Les souches sélectionnées pour la mise en évidence de l'activité enzymatique sur milieu Br.	15
3	exemple d'aspects macroscopiques des souches cultivés sur milieu Br. A gauche , souche A9. A droite , souche BS3.	16
4	exemples d'activités enzymatiques d'amylase. A droite , avec lugol. A gauche , sans lugol.	17
5	exemple d'activité protéolytique.	17
6	exemple d'activité caséinase	18
7	exemple d'activité des souche et surnageant lipolytique (l'huile d'olive).	18
8	exemple d'activité d'estérase (tween 20).	19

9	exemple l'activité gélatinase, avec TCA	19
10	exemple de traitement thermique d'activité gélatinase à 70°C.	21
11	exemple de traitement thermique d'estérases (Tween 80) à 100°C.	22
12	L'effet de Butanol sur l'activité enzymatique pour tween 20 (BW2-2) et d'Acétonitile sur gélatinase (BW1-2) respectivement.	26
13	l'effet de méthanol sur gélatinase (BW1-2), et protéase (BS3) respectivement	27

Liste des tableaux

Numéro Du tableau	Titre du tableau	Numéro de La page
I	Comparaison entre les trois domaines de vie	1
II	classification des halotolérants et halophiles	5
III	tableau de différente activité enzymatique retrouvée chez les cultures	20
IV	tableau des déferlantes activités enzymatique retrouvées chez les surnageant	20
V	effet de la température sur les enzymes extracellulaire	22
VI	effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire protéolytique	23
VII	effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire amylolytique.	24
VIII	effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire de gelatinase.	24
IX	effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire de l'estérase (Tween 20).	24
X	effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire de l'estérase (Tween 80).	25

Liste des abréviations

ARNr 16S	Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
ADN	Acide désoxyribonucléotidique
ARN	Acide ribonucléotidique
NaCl	Chlorure de sodium
KCl	Chlorure de potassium
NaOH	Hydroxyde de sodium (1N)
HCl	acide chlorhydrique (1N)
Mg SO ₄	sulfate de magnésium
TCA	L'acide trichloracétique (35%)
MBr	Milieu Brown
SN	surnageant
SV _T	Solvant témoin
SN _T	Surnageant témoin
SVL	solvant
T20	Tween20
T80	Tween80
Rpm	Rotation par minute

Liste des symboles

C°	Degré Celsius
H	heure
Min	Minuit
L	litre
ml	millilitre
µl	microlitre
T°	température
pH	potentiel d'hydrogène
Tr/min	tours/minute
v/v	volume/volume
p/v	poids/volume
g	gramme
g/l	Gramme/litre

Introduction

Introduction

Introduction

Les environnements hypersalins sont des habitats extrêmes, couvrant la plupart de la surface de la terre, dans lesquels plusieurs facteurs (en plus de la teneur élevée en sel), peuvent limiter la croissance des organismes, Ces facteurs comprennent la température, le pH, la pression et la disponibilité en nutriment (**Rodriguez-Valera, 1980**).

Les enzymes hydrolytiques extracellulaires telles que les amylases, les protéases, les lipases et les xylanases ont divers usages potentiels tels que leur utilisation comme additifs alimentaires et dans la fabrication des produits chimiques

La recherche sur les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles a été abordée par Nordberg et Hofsten en 1969. Ces propriétés ont fait des enzymes halophiles d'excellents candidats pour différentes applications biotechnologiques dans de nombreux processus industriels (**Setati, 2010**).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés au criblage de souches halophiles ayant une activité enzymatique d'intérêt biotechnologique. Le mémoire est composé de deux parties essentielles

- Une synthèse bibliographique :

Comportant les mécanismes d'adaptation des souches d'archées halophiles extrêmes, au milieu hypersalin, afin de comprendre l'intérêt des molécules produites par ce type de microorganismes d'une part, et les différents métabolites produits, ainsi que leur intérêt dans le domaine biotechnologique.

- Une partie pratique dans laquelle nous avons abordé deux aspects :
 1. La mise en évidence des activités enzymatiques (amylolytique, protéolytique, lipolitique....)
 2. Etude de la Stabilité de ces molécules à haute température et en présence de solvants.

Nous terminerons avec une troisième partie où nous présentons les résultats obtenus ainsi qu'une conclusion et perspectives.

Synthèse

Bibliographique

Chapitre I : les microorganismes halophiles

I- Les environnements hypersalins

Les environnements hypersalins sont les environnements qui ont une concentration en sels plus élevée que celle de l'eau de mer (**Rodriguez-Valera, 1980**).

La diversité des propriétés des habitats salins et hypersalins sur terre est reflétée par la grande diversité au sein des communautés microbiennes adaptées à la vie sous les conditions dominantes (**Oren, 2002a; 2002b; 2006**). Ces propriétés sont principalement définies selon la concentration totale en sel et la composition ionique (**Rodriguez-Valera, 1993; McGenity et al., 2000; Oren, 2002a; 2006**).

- Quelques caractéristiques de Comparaison entre les trois domaines archaea, bacteria, eucarya sont resumées dans le tableau I

Tableau I : Présente différentes caractéristique des trois domaines de vie présente

caractéristique	archaea	bacteria	eucarya	Références
Caractéristique physiologiques	Aérobic et anaérobic	Aérobic et anaérobic, chlorophyllienne	Très largement aérobic, chlorophyllienne	Briffotaux, 2008
Taille typique	1 à 4 µm	1 à 4 µm	Supérieure à 5 µm	
Paroi cellulaire	Protéine, glycoprotéine, pas de paroi mais une couche S (S-layer)	Peptidoglycane (muréine) et LPS, rarement formé de protéines, formes sans parois rares	Grande variété, absence de peptidoglycane	Briffotaux, 2008
Organelles internes	absent	absent	présent	yang et al., 2009
Locomotion	Flagelle simple, plusieurs types de flagelline	Flagelle simple, glissement, un seul type de flagelline	Flagelles complexes, cils, pattes, nageoires, ailes	Briffotaux, 2008
Transcription				
ARN polymérase	Complexe (1 type, 12 sous-unités)	Simple (1 type, 4 sous-unités)	Complexe (3 types, nombreuses sous-unités)	Briffotaux, 2008

Synthèse bibliographique

Mode de fixation de l'ARN Pol sur le promoteur	Protéine TBP (TATA binding protein) Promoteur : séquence TATA située à -25 pb du site d'initiation	Facteur σ Promoteur : séquences situées à -35 pb et -10 pb du site d'initiation	Protéine TBP Promoteur : séquence TATA située à -25 pb du site d'initiation	Briffotiaux, 2008
Replication de l'ADN				Briffotiaux, 2008
Origine de réplication	Une ou plusieurs origines de réplication selon les espèces	Une seule origine de réplication Ori C	Plusieurs origines de réplication impliquant le complexe Ori C	Briffotiaux, 2008
Hélicase	MCM (Minichromosome maintenance complexe)	DnaB	MCM (Minichromosome maintenance complexe)	Briffotiaux, 2008
ADN Polymérase	Famille B et D pour les <i>Euryarchaeota</i> , Famille B pour les <i>Crenarchaeota</i>	Pol I (famille A), Pol II (famille B), Pol III (famille C)	Principales ADN Pol : Pol α , Pol δ , Pol ϵ (famille B)	Briffotiaux, 2008
vitesse de réplication kb/min	15-20	50	2	Briffotiaux, 2008
taille de fragments d'Okazaki	~120	~ 2000	~120	Briffotiaux, 2008
Traduction				
ribosomes	70S=30S+50S	70S=30S+50S	80S=40S+60S	Briffotiaux, 2008
ARNr	16S/5S+23S	16S/5S+23S ~1400nt ~130nt ~3000nt	18S/5S+5,8S+28S	Briffotiaux, 2008
Le nombre d'opérons ribosomiaux	1 seul opéron sauf méthanogènes et halophiles	de 1 à 7 (E. coli) ou plus	beaucoup	Briffotiaux, 2008
les gènes opéron r:	16S—ARNt—23S	16S—tARN—23S — 5S—	18S—5,8S—28S et 5S à part	Briffotiaux, 2008

	et 5S à part	tARN		
codons d'initiation	ATG, GUG, UUG	ATG, GUG, UUG	ATG	Briffotiaux, 2008
Génomes				
Matériel génétique	ADN double brin circulaire ferme par covalence	ADN double brin circulaire fermé par covalence	Vrai noyau avec une multitude de chromosomes linéaire	Schaechter M., 2004
histones	présent	absent	présent	Hogg S., 2005
Introns dans l'ARN	Présent	absent	présent	Yang et al 2009

• Diversité phylogénétique des halophiles

Les halophiles présentent une grande diversité phylogénétique. On le trouve parmi les trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria et Eucarya (Figure 1) (**Oren, 2002a**). Ils sont capables de survivre dans ces conditions extrêmes de salinité. Cette contrainte est à la base des propriétés halophiles de ces organismes et de leurs composants, qui doivent fonctionner en présence de concentrations multimolaires de sel à l'intérieur de leur cellule.

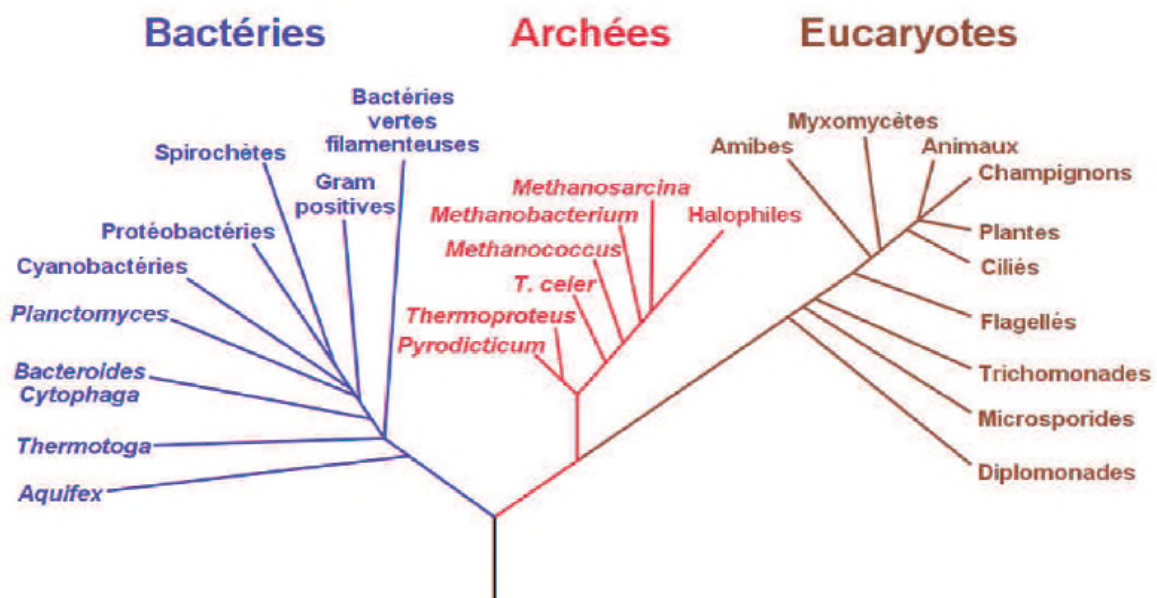


Figure N°1 : Arbre phylogénétique des êtres vivants (Marty., 2011).

I- Les archées halophiles extrêmes :

1- Définition : Les halophiles sont des organismes sains qui habitent dans les environnements hypersalins. Ils incluent principalement des procaryotes et microorganismes eucaryotes ayant la capacité d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement et résiste à l'effet dénaturant des sels (**Das Sarma, 2010**).

Un organisme halophiles du grec (alos, sel et philein, aimer) est un organisme qui a un besoin absolu de forte concentration en sel pour vivre

On distingue deux types d'halophiles :

- halophiles extrêmes
- halophiles modérés

2- Caractères généraux

2-1- La différences entre les halotolérants et les halophiles

Parmi les trois domaines du vivant: archaea, bacteria, eucarya on trouve des microorganismes halophiles et halotolérantes. Ils sont capable de survivre dans des conditions extrêmes et croit en présence de chlorure de sodium (NaCl), il est parfois difficiles d'établir des limites qui définissent l'halophilismes et l'halotolérantes car plusieurs facteurs comme la concentration, la température, la présence de quelque nutriments et la présence de sel modifiaient considérablement la réponse de NaCl

Les halophiles sont des organismes qui nécessitent des concentrations élevées en sel, plus de 0,2 M pour leur croissance, et qui ont la capacité de résister aux effets du stress osmotique. (**Das Sarma et al., 2010**).

D'autre part les halotolérants sont des organismes qui sont capables de pousser dans des milieux à haute salinité, cependant ils peuvent également s'accroître en l'absence de sel, et dont la concentration optimale de sel de croissance est relativement faible (Anton, 2014). Ceux qui sont capables de se développer approximativement au-dessus de 15% (p/v) (2.5M) de NaCl sont considérés comme extrêmement halotolérants (**Oren, 2006; Agwua et Oluwagunke, 2014**).

Les halophiles et les halotolérants ont émergé comme un vaste dépôt de nouvelles enzymes au cours des dernières années (**Kumar et al., 2012**). Selon la classification de Kushner (1993), faite en fonction de leur réponse au NaCl, en se basant sur leur croissance maximale, les halophiles se répartissent entre cinq catégories différentes (tableau II)

Tableau II: classification des halotolérants et halophiles (**Kushner, 1993**).

Catégories	NaCl (% p/v)
Non-halophile	moins de 1%
Halophile léger	1-3%
Halophile modéré	3-15%
Halophiles à bord extrême	9-23%
Halophiles extrêmes	15-32%

2-2- Les halovirus

Halovirus sont employé dans différents systèmes d'hypersalin, y compris les virus, bactériens, archaea, et eucaryotiques. Les virus sont les réservoirs les plus abondants d'information acide-codée nucléique dans la biosphère et dépassent les cellules en nombre 10 à 100 fois (**Aalto et al 2012, Dyall-Smith et al 2003, Guixa-Boixereu et al 1999**).

Bien qu'organismes de tous les domaines de la vie sont trouvés dans les environnements d'hypersalin, la majorité, des halovirus infectent jusqu'à présent seulement l'archaea (**Atanasova et al 2015b**).

2-3- L'intérêt des archées halophiles

La capacité des microorganismes à vivre dans des milieux hyper-salés ainsi que leurs propriétés structurales et fonctionnelles leur a donné un important potentiel biotechnologique. Ainsi, les halophiles renferment quelques structures d'intérêt essentiel. Dans ce qui suit, on

s'est intéressé à la description de certaines bio-structures évoquant d'une part, leurs propriétés et d'autre part, l'intérêt de leur application.

Les microorganismes qui se développent dans des conditions extrêmes sont considérés comme une source importante d'enzymes stables et de grande valeur. Ces dernières appelées parfois « **Extrêmozymes** » assurent les mêmes fonctions de catalyse enzymatique que leurs homologues non-extrêmes, mais ils peuvent catalyser les même réactions dans des conditions qui inhibent ou dénaturent les formes moins extrêmes. Une partie de ces extrêmozymes peuvent être polyextrémophiles et afficher une activité dans plus d'une condition extrême par exemple à basse température, en milieu alcalin etc. La compréhension de la stabilité de fonctionnement de ces extrêmozymes constitue une base importante pour les innovations en matière de biotechnologie (**Karan et al., 2012**).

Chapitre II : métabolites produits par les halophiles extrêmes

I- Les enzymes produites

Les enzymes sont des molécules catalyseurs très importantes utilisées dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques et cosmétiques. Ces enzymes présentent cependant des performances relativement médiocres au regard des températures élevées. Cependant, beaucoup d'activités enzymatiques d'archées halophiles ont été caractérisées, y compris des enzymes à intérêt potentiel, telles que les cellulases, les xylanases, les amylases, les lipases, les protéases et les gélatinases. (**Fukushima et al., 2005**).

Les enzymes halophiles en particulier extracellulaires utilisées pour la récupération des métaux, les aliments, détergents. (**Onishi et al., 1980**).

1- Protéase

Les microorganismes halophiles produisent des protéases avec une stabilité élevée au sel saturé. Les concentrations ou la tolérance au solvant organique qui peuvent avoir de nouvelles applications (**Schinner et al., 2001**).

Elles sont appliquées dans des processus industriels comme les additifs détergents, la transformation des produits alimentaire et le processus pharmaceutique.

2- Amylase

Quelques α -amylases ayant des propriétés fonctionnelles similaires ont été purifiés et caractérisés à partir des microorganismes halophiles (**Perez-Pomares *et al.*, 2003**).

Les amylases sont parmi les enzymes hydrauliques, ayant des propriétés fonctionnelles, sont appliquées dans tous processus industriels tel que les aliments, les détergents, et les textiles.

3- Lipase et estérases

La lipase est l'une des enzymes hydrolytiques les plus importantes avec un potentiel dans divers domaines de l'industrie pharmaceutique et l'agriculture. (**Amoozegar *et al.*, 2008**).

Les enzymes hydrolysant les esters carboxyliques sont ubiquistes et ont été trouvées dans les trois domaines du vivant et chez certains virus. En présence d'eau, elles catalysent l'hydrolyse d'une liaison ester pour donner un transe-estérification. Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les chaînes carbonées courtes et ne sont pas actives sur les substances qui forment des micelles.

4- Les xylanases

Les xylanases (nom systématique 1,4- β -D-xylane xylanohydrolase, (EC.3.2.1.8) sont les enzymes qui hydrolysent les liaisons β (1, 4) entre deux résidus β -D-xylanopyranoses.

Elles sont utilisées dans l'industrie de boulangerie pour améliorer les propriétés de la pâte, dans le bioblanchiment de papier et de pulpe (**Mamo *et al.*, 2009**). Cependant, l'application efficace des xylanases dans le bioblanchiment exige que ces enzymes soient alcaliphiles et thermotolérantes.

Les organismes halophiles sont la source la plus susceptible des enzymes avec de telles propriétés. Bien que la recherche dans cet axe soit encore limitée, seulement quelques xylanases halophiles ont été décrites (**Guo *et al.*, 2009**)

Une partie de ces enzymes montre une grande stabilité dans un intervalle large de pH (6 à 11) et reste active à des températures au-dessus de 60°C (**Wejse *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2009; Prakash *et al.*, 2009b**).

5- Les cellulases

Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons β -osidiques entre les résidus glycosyliques (Lynd *et al.*, 2002).

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés (Beldman *et al.*, 1985). et ne sont pas des métalloprotéines (Saha *et al.*, 1994). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts: le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide glycolyse flexible riche en sérine, proline et thréonine appelé «linker» (Hasper *et al.*, 2002; Receveur *et al.*, 2002).

Les cellulases sont principalement utilisées dans l'industrie textile pour le bioblanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pour ramollir les tissus (Aygan et Arıkan, 2008). L'intérêt aux cellulases augmente également dans la production du bioéthanol comme les enzymes qui sont employées pour hydrolyser les matériaux cellulotiques prétraités pour les sucres fermentescibles (Wang *et al.*, 2009). Actuellement, des cellulases halophiles dérivées de Bacillus sp. (Aygan *et al.*, 2008) et de Salinivibrio sp. (Wang *et al.*, 2009).

Elles sont thermostables et également stables à l'alcalinité et à la salinité ce qui fait d'elles des candidats idéaux pour différentes applications industrielles.

6- Les nucléases H

"M. Varians sub sp. Halophilus "Produit une nuclease (nuclease H) Lorsqu'elle est cultivée en 1 à 4 M de NaCl ou KCl. L'enzyme purifiée comporte à la fois des activités DNase et RNase. Une autre nucléase halophile (une exonucléase, libérant 5'-mononucléotides à la fois de l'ADN et l'ARN) elle a été produite par Bacillus halophilus (Onishi *et al.*, 1983).

7- Intérêt des enzymes halophiles

Les Halophiles produisent une grande variété de biomolécules stables et uniques qui peuvent être utiles pour des applications pratiques. Les micro-organismes halophiles produisent les enzymes stables hydrolytiques telles que, lipases, amylases, gélatinases et protéases, capables de fonctionnement dans les conditions qui mènent à la précipitation ou dénaturation de la plupart des protéines.

Les protéines halophiles concurrencent effectivement avec des sels pour l'hydratation, une propriété qui peut avoir comme conséquence la résistance à l'autre bas-eau-activité environnement, comme en présence des dissolvants organiques.

Des biomolécules halophiles nouveaux peuvent également être employés pour des applications spécialisées, par exemple le des biomolécules halophiles nouveaux peuvent également être employés pour des applications spécialisées, par exemple le bacteriorhodopsin. Les vésicules de gaz pour les particules de flottement de bio-ingénierie, les colorants pour le colorant alimentaire, et corps dissous compatibles comme protectants d'effort (**Das Sarma 2001**).

II-Autres composés

2-1- Production des corps dissous compatibles

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants produisent ou accumulent dans le cytoplasme des composés organiques de faibles poids moléculaires (solutés compatibles ou osmoprotecteurs) pour l'équilibre osmotique.

Une grande variété de solutés compatibles a été identifiée dans le monde microbien. Les mieux connus sont la glycine bêtaïne, les sucres, et dérivés d'acides aminés. Certains de ces solutés osmotiques ont trouvé des applications en biotechnologie (**Lentzen et Schwarz, 2006**).

2-2- Production d'exo polysaccharides

Les halophiles produisent des exo polysaccharides qui peuvent être secrétés dans les milieux extérieur. Ils ont un intérêt biotechnologie en raison de leur capacité a augmente la viscosité des milieux aux valeurs basse de PH, ils sont employés en médecines, pharmacie, dans les produits de beauté et dans l'industrie de pétrole (**Quesada et al., 2004**)

2-3- Production des pigments et antibiotiques

▪ Caroténoïdes

Plusieurs halophiles qui produisaient des caroténoïdes ont isolé et ont caractérisé de solaires qui fabriquent de sel. (**Pathak, et Sardar 2012**).

Arytenoïdes sont de groupe principal et la plupart abondant de colorant dans les bactéries pigmentées par marine qui apparaît habituellement l'orange, le jaune ou le rouge en couleurs. Le colorant de caroténoïde montre également antimicrobien comprenant l'activité antibactérienne (**Gulani et al., 2012**).

▪ Antibiotiques

L'antibiotique est dérivé de l'antibiosis signifie « contre la vie ». Il peut être épuré de microbien fermentation et modifié chimiquement ou enzymatique pour des études fondamentales.

Les halophiles auraient une importance accrue dans la médecine et dans l'industrie de soins de santé encore davantage de recherche sur les aspects ci-dessus peut être entreprise. Ainsi ces la protéine a épuré des extraits obtenue à partir des halophiles semble être une source possible d'arrêter la croissance et activités de métabolite de divers micro-organismes pathogènes.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire génie biologique de l'université A. Mira de Bejaia le but était la recherche d'enzymes hydrolytiques d'intérêt biotechnologique produites par des souches d'archées halophiles locales.

I. Matériel biologique

Les souches

Les souches utilisées dans cette étude sont des archées halophiles extrêmes isolées d'environnements hyper salins algériens. Au total, neuf souches ont fait-l'objet d'un criblage pour la production d'enzymes. Deux d'entre elles sont isolées à partir de la saline d'Ichakaben de la wilaya de Bejaia. Il s'agit de A9 et SH. Quatre sont isolées du chott El Beida dans la wilaya de Sétif (Il s'agit des BW et de BS3).

Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour la revivification des souches halophiles est le milieu Brown (Br) qui répond aux exigences nutritionnelles des micro-organismes halophiles selon leurs concentrations élevée en NaCl ou bien KCl et la présence des acides aminés sans oublier la teneur en $MgSO_4$ qui est spécifique à ce genre de micro-organismes.

- Le milieu Br est préparé à pH neutre (7,2).
- La composition du milieu est donnée en **annexe II**.
- Les milieux de culture utilisés pour le criblage des, différents métabolites sont mentionnés dans **l'annexe II**.

Appareillage et réactifs est donnée en **annexe I**.

II. Méthodes

II.1- La mise en cultures les souches(Revivification)

Milieu liquide

✓ Revivification des souches :

A partir de chaque suspension bactérienne conservée à 4°C, nous avons effectué des inoculations. 3 ml du milieu de culture liquide Br à 10% est inoculé par 50µl de la suspension

conservée, ensuite les cultures sont incubées dans bain marie à 40°C avec agitation de 200 rpm pendant 5 à 6 jours (jusqu'à l'apparition d'un trouble).

Milieu solide :

Après une semaine de la revivification des souches et l'incubation à 40 °C, 1 µl de chaque culture liquide estensemencée dans chaque boîte qui contient le milieu Br solide par la méthode des stries. Pour ce faire, on utilise une anse de platine. Cet instrument est stérilisé entre chaque utilisation.

Les boîtes sont mises dans des sachets en plastique fermés pour éviter la dissociation des milieux (**Rodriguez et al ,1980**), incubées à 40°C jusqu'à l'apparition des colonies.

II.2- La mise en évidence des activités enzymatiques

La production d'hydrolases est recherchée qualitativement sur milieu (Br) solide modifié par réduction de la quantité d'extrait de levure à 0,3 g/L (milieu de base) par rajout de polymère-test (**Oren et al, 1997**).

Après solidification de milieu(Br), des puits sont découpés est 50µl de surnageant de culture y sont déposés.

Les souches testés en été centrifugé dans des eppendorf, à 1000 rpm pendant 10 min afin de séparé le culot du surnageant. Ce dernier est mis dans un nouvel eppendorf stérile, et sont récupère afin de recherche des différents métabolites.

Détermination de l'activité amylolytique

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par (**Amoozegar et al. 2003**), en utilisant le milieu de base additionné de 1% (p/v) d'amidon soluble. Après incubation à 40 °C, les colonies sont inondées avec une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

Détermination de l'activité protéolytique

▪ Recherche de la caséinase :

Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées à 40 °C. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse de la caséine (**Roxana et al., 2009**).

▪ Recherche de protéase de lait écrémé :

Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de lait écrémé. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées 40 °C. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse de protéase de lait.

Détermination de l'activité lipolytique et estérase

La recherche d'estérase est effectuée par le test d'hydrolyse des Tweens 20 et 80 alors que celle de Lipase est effectuée par l'hydrolyse de l'huile d'olive. Cette activité est recherchée sur milieu de base contenant 1% (v/v) de Tween 20 ou de Tween 80 (**Gonzalez et al, 1978**), ou encore de 2,5% (v/v) d'huile d'olive (**Sigurgísladóttir et al, 1993**). L'ensemencement des souches est effectué par des puits. Après incubation à 40 °C, le développement d'un précipité autour des touches témoigne la présence d'une lipase.

Détermination de l'activité gélatinase

Le milieu de base est supplémenté par 0,8 % (p/v) de gélatine. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées à 40 °C. L'hydrolyse est révélée par addition de 1 à 2ml du réactif TCA (10%) en surface afin de mieux observé les zones claire. Une zone claire indique la production d'une gélatinase (**Kim et Hoppe, 1986**).

II-3- Etudes de la stabilité thermique des enzymes

La stabilité thermique des surnageant a été traité dans le bain marie à température 70 °C et 100°C pendant 10 min. Après refroidissement de ces surnageant on a déposé 50µl dans chaque boîte.

La stabilité thermique de l'activité amylase

Après solidification de milieu (Br) à 1% d'amidon, des puits sont découpés et 50µl de surnageant traité y sont déposés, puis incubés à 40°C.

La stabilité thermique de l'activité protéase

Après solidification de milieu (Br) (M1 et M2), des puits sont découpés et 50µl de surnageant traité y sont déposés, puis incubation à 40°C.

La stabilité thermique de l'activité lipase

Après solidification de milieu (Br) (M3, M4, M5), et puis nous avons déposés 50µl de surnageant traité puis incubation à 40°C.

La stabilité thermique de l'activité gélatinase

Après solidification de milieu (Br) à 0.8% de gélatine, et puis nous avons déposés 50µl de surnageant traité puis incubation à 40°C.

II.4- Effet des solvants organique sur l'activité enzymatique

La stabilité d'activité enzymatique a été étudiée en présence des solvants organiques telle que l'acetonitrile, butanol et méthanol.

Nous avons mélangé 25µl de chaque solvant avec 25µl de surnageant qui ont une activité enzymatique (l'apparition de la zone claire), puis incubation à la température ambiante pendant une heure.

A l'aide d'une micropipette nous avons déposé 50µl des mélanges dans les puits, et incubés à 40°C (Karthikeyan, P., aout 2013).

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

I. Mise en culture des souches (Revivification)

Milieu liquide

✓ Revivification des souches

Pour les souches revivifiées à partir des cultures conservées à 4°C au réfrigérateur, nous avons eu des troubles dans les tubes au bout du cinquième jour d'incubation au bain marie à 40°C sous agitation à 200 rpm. Nous avons noté que toutes les souches poussées plus rapidement dans le milieu Br.

Sous les conditions optimales de croissance, les cultures liquides sont de couleur rose. Selon Burns et coll., 2007, à hautes densités cellulaires, les pigments caroténoïdes des haloarchées donnent souvent une couleur rose distinctive aux milieux liquides. Ils sont partiellement responsables des pigmentations roses typiques des lacs salins et des étangs hautement concentrés en sel ou ils prédominent (Ventosa et al., 1999).

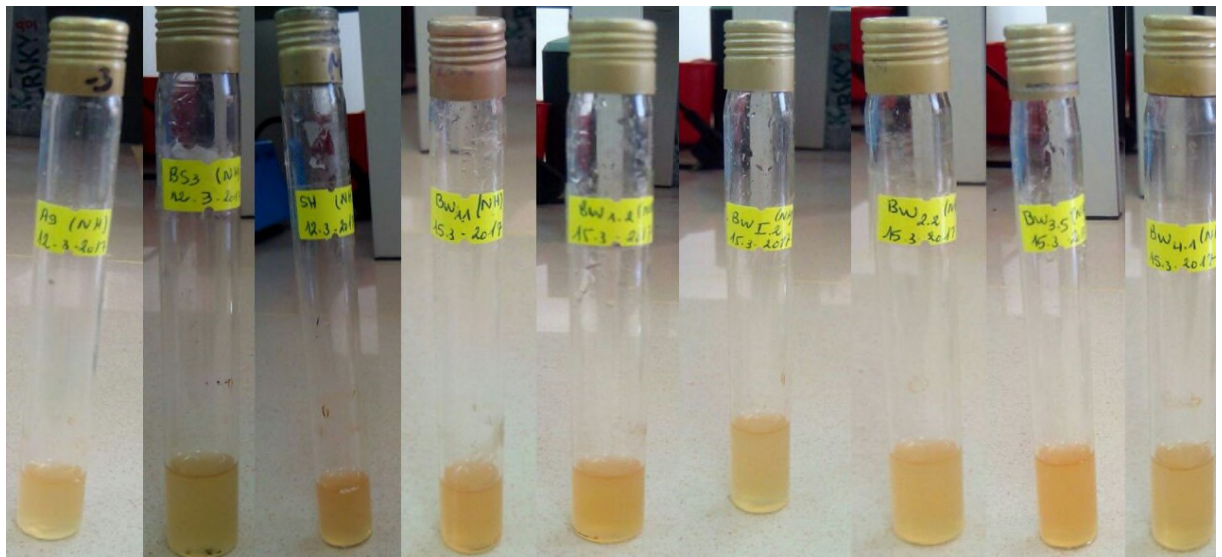


Figure N°2: Les souches sélectionnées pour la mise en évidence de l'activité enzymatique sur milieu Br.

Milieu solide

✓ Aspect des colonies

Après 7 jours d'ensemencement des souches sur le milieu de culture Br et incubation à 40°C. La plupart des souches forment sur milieux solides des colonies, plates, circulaires, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm (**figure 3**). Elles sont toutes pigmentées en orange, ou en rose. Ce type de pigmentation est un trait caractéristique des archaea halophiles extrêmes dû à un pigment de type caroténoïde (**Grant et al., 2001; Oren et Rodriguez-Valera, 2001**).



FigureN °3 : exemple d'aspects macroscopiques des souches cultivés sur milieu Br. **A gauche**, souche A9. **A droite**, souche BS3.

II. La mise en évidence des activités enzymatiques

Les activités amylolytique, protéolytique et lipolytique ont été mises en évidence en utilisant respectivement (7) substrats différents : amidon, lait écrème, caséine, huile d'olive, Tween 80, Tween 20 et la gélatine, respectivement.

Tous les isolats sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires avec une prédominance de l'activité lipolytique (tween 20 et 80) et de gélatinase.

Résultats et discussion

❖ Activité amylase

Parmi les souches que nous sommes proposées d'étudier, trois ont une activité amylolytique, que ce soit ces souches sont donc productrices de cette enzyme BW2-2, BW3-5 et BW4-1 (**figure N°4**)

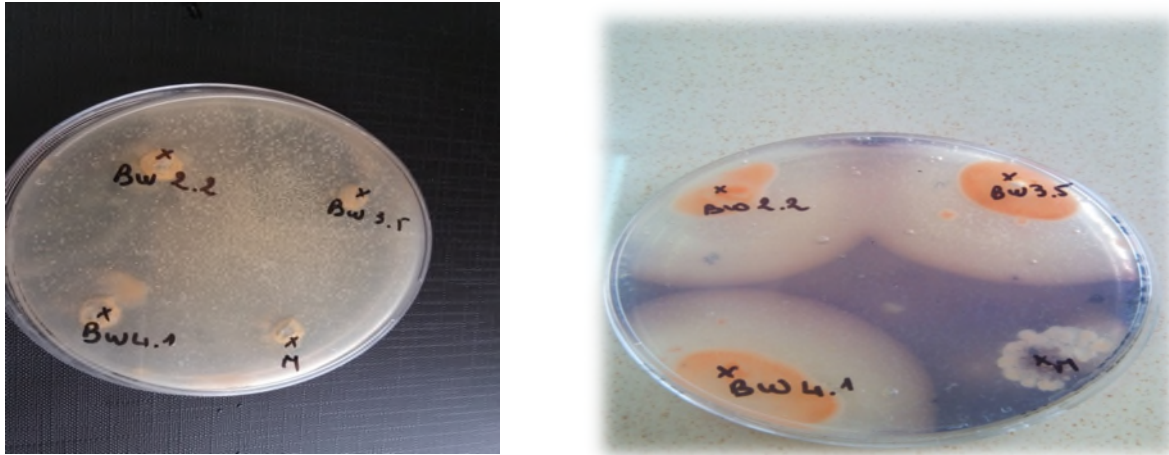


Figure N°4 : exemples d'activités enzymatiques d'amylase. **A droite,** avec lugol.
A gauche, sans lugol.

❖ Activité protéase

- **Lait écrémé :** toutes les souches que nous sommes proposées d'étudier, ont une activité Protéase. Donc cette souche, est productrice de cette enzyme (**figure N°5**)



Figure N° 5: exemple de l'activité protéolytique.

Résultats et discussion

- **Caséine** : toutes les souches que nous avons étudiées n'ont aucune activité caséinase. Donc ces souches ne produisent pas cette enzyme (**figure N°6**)

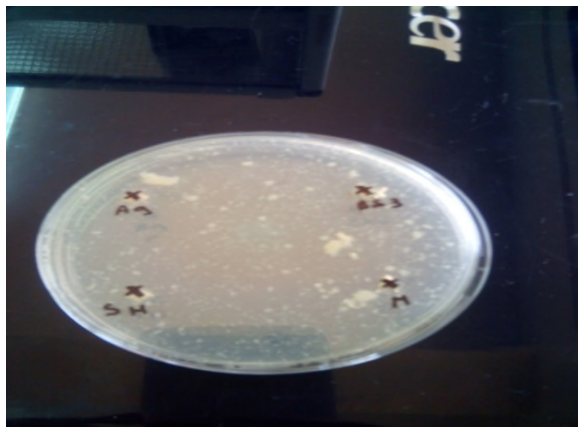


Figure N°6 : exemple d'activité caséinase

❖ Activité lipase

L'huile d'olive : les souches que nous avons proposées à étudier n'ayant pas une activité lipolytique, la souche BW1-1 uniquement est capable de dégrader la lipase (**figure N°7**).

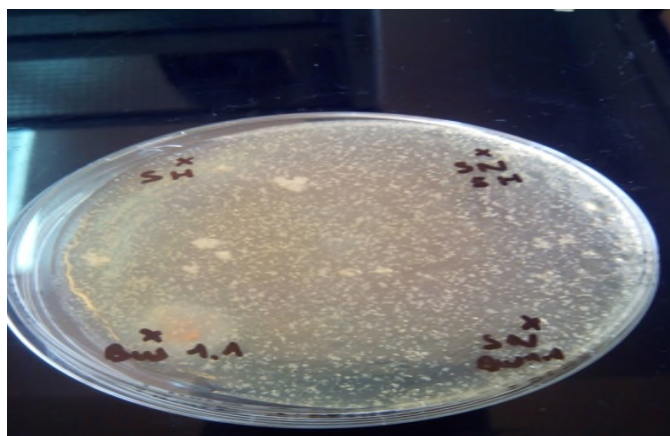


Figure N°7: exemple d'activité des souches et surnageant lipolytique (l'huile d'olive).

Résultats et discussion

❖ Activité d'estérase

- **Tween 20 et 80** : toutes les souches, présentent une activité estérase, donc ces souches produisent l'estérase (**figure N°8**)



Figure N°8 exemple de l'activité d'estérase (tween 20).

❖ Activité gélatinase

Les souches que nous sommes étudiés, présentent une activité gélatinase. Donc ces souches produisent la gélatinase (**figure N°9**)

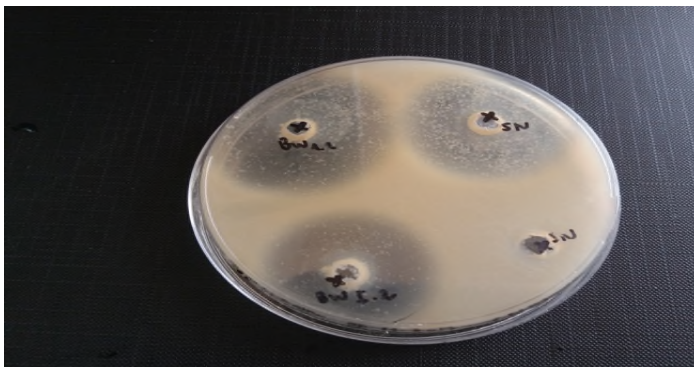


Figure N°9: exemple l'activité gélatinase, avec TCA.

Résultats et discussion

- Les tableaux suivants présentent la différente activité enzymatique retrouvées chez les différentes cultures ainsi que leurs surnageant respectifs.

Tableau III : Tableau de la différente activité enzymatique retrouvée chez les cultures

Souche	Amylase	Protéase		Lipase L'huile d'olive	Estérase		Gélatinase
		Lait écrémé	Caséinase		Tween 20	Tween 80	
A9	-	+	-	-	+	+	+
BS3	-	+f	-	-	+	+	+
SH	-	+f	-	-	+f	+	+
BW1-1	+	+	-	+	+f	+	+
BW1-2	+	+f	-	-	+	+	+
BWI-2	+	+	-	-	+	+	+
BW2-2	+	+	-	-	+	+	+
BW3-5	+	+	-	-	+	+	+
BW4-1	+	+	-	-	+	+	+

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative, (f) : réaction faible.

- La présence des zones claires est due à la dégradation des métabolites par différentes enzymes. Ces enzymes peuvent être excrétés en dehors de la cellule productrice (enzymes extracellulaires).

Tableau IV: tableau des différentes activités enzymatique retrouvées chez les surnageant

Surnageant	Amylase	Protéase		Lipase L'huile d'olive	Estérase		Gélatinase
		Lait écrémé	Casernase		Tween 20	Tween 80	
A9	-	+	-	-	+	+f	-
BS3	-	+	-	-	+	+	-
SH	-	+	-	-	+f	+f	-
BW1-1	+	+	-	-	+f	+	-
BW1-2	+	+	-	-	+f	+	+

Résultats et discussion

BW1-2	-	+	-	-	+f	-	-
BW2-2	+	+	-	-	+f	+f	-
BW3-5	+	-	-	-	+	+f	+
BW4-1	+	-	-	-	+f	+	-

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative, (f) : réaction faible.

Tous les isolats obtenus sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ils sont dotés, principalement, d'une activité protéolytique, lipolytique et amylolytique. L'activité hydrolytique la plus abondante est celle de la dégradation de tween 20 (9 souches sur 9).

L'hydrolyse de tween 20 par les souches obtenues est également importante (9 souches). Pour le reste des activités, celle de la dégradation de l'huile d'olive est la plus faible (un seul isolat).

Les résultats confirment que les souches ont une activité enzymatique, mais ne nous permettent pas de dire si l'activité est sécrétée ou non.

On remarque aussi une différence de clarté des zones très claire pour les souches qui ont une forte production d'enzyme, par contre les zones claires pourraient être dues à la production d'enzyme mais pas à grande concentration.

Pour mieux voir la zone d'hydrolyse de gélatinase en ajout le TCA à 10%, par inondation. Cependant, les zones deviennent plus claire (TCA précipite les protéines hydrolysées).

III -3- Etudes de la stabilité thermique des enzymes

On remarque d'après la figure des zone claire des surnageant ayant une activité enzymatique après le traitement thermique à 70°C pendant 10 min (**figure N°10**).

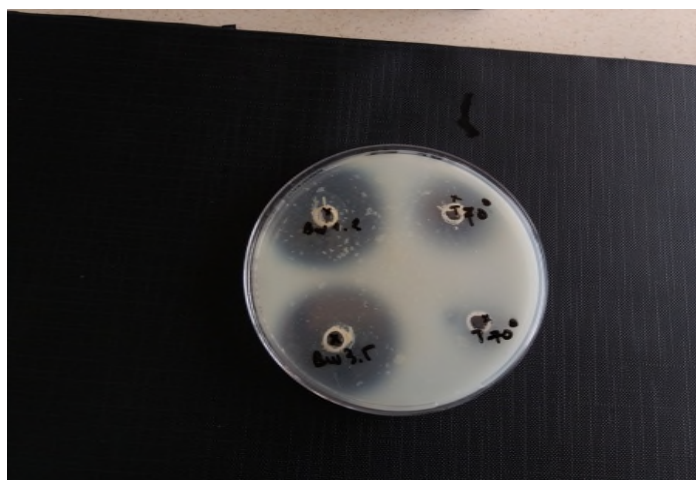


Figure N°10: exemple de traitement thermique d'activité gélatinase à 70°C.

Résultats et discussion

➤ Absence des zone claire des surnageant des souches traité à 100°C pendant 10min
Tous les tests réalisés sont négatifs. Ce qui traduit l'absence d'activité enzymatique (**figure N°11**)

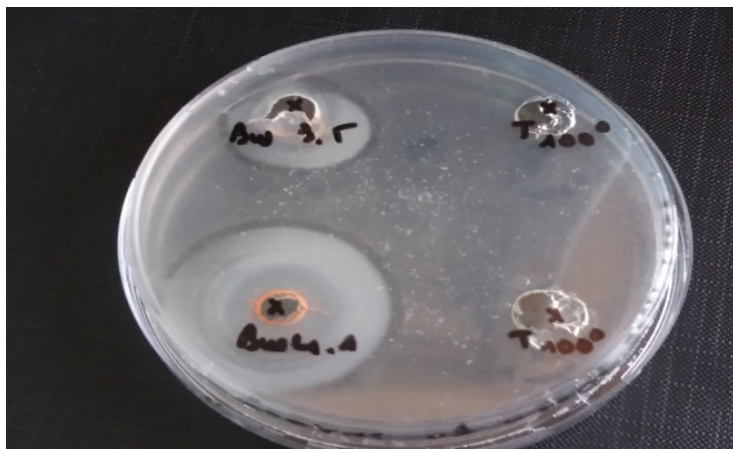


Figure N°11: exemple de traitement thermique d'estérases (Tween 80) à 100°C.

Tableau V: Effet de la température sur les enzymes extracellulaire

Les enzymes	Les souches	T ₊	Traitement à 70°C	Traitement à 100°C
Amylase	BW1-1	+	+	-
	BW1-2	+	-	-
	BW2-2	+	+	-
	BW3-5	+	+	-
	BW4-1	+	+	-
Protéase de lait	A9	+	-	-
	BS3	+	-	-
	SH	+	-	-
	BW1-1	+	-	-
	BW1-2	+	-	-
	BW I-2	+	+	-
	BW2-2	+	-	-
Gélatinase	BW1-2	+	+	-
	BW3-5	+	+f	-

Résultats et discussion

Tween 20	A9	+	-	-
	BS3	+	-	-
	SH	+	-	-
	BW1-1	+	-	-
	BW1-2	+	-	-
	BWI-2	+	-	-
	BW3-5	+	-	-
	BW4-1	+	-	-
Tween 80	A9	+	-	-
	BS3	+	-	-
	SH	+	-	-
	BW1-1	+	-	-
	BW1-2	+	-	-
	BWI-2	+	-	-
	BW2-2	+	-	-
	BW3-5	+	-	-
	BW4-1	+	-	-

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative, (f) : réaction faible, T₊ : témoin positif (non traite).

- Après le traitement thermique à 70°C pendant 10 min, quelques enzymes conservés son actives, elle est donc thermostable, l'activité disparaît après traitement thermique à 100°C Pendant 10 min.

III -4- Effet des solvants organique sur l'activité enzymatique

Après 1 heure de contact des enzymes extracellulaire actifs avec différents solvants organiques (mélange de 25µl de chaque solvant avec 25µl des surnageant qui ont une activité enzymatique). Les résultats montrent que 70% de l'activité résiduelle est conservée en présence de méthanol, acétonitile et disparaît complètement avec butanol.

Résultats et discussion

Tableau VI: Effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire protéolytique

SLV	Butanol			Acétonitile			Méthanol		
	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN
A9	+	-	-	+	-	+	+	-	-
BS3	+	-	-	+	-	-	+	-	-
SH	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW1-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW1-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BWI-2	+	-	-	+	-	-	+	-	+
BW2-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-

SN_T: surnagent témoin. (+) : présence de la zone

SV_T: solvant témoin. (-) : absence de la zone

SLV : les solvants

Tableau VII: Effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire amylolytique.

SLV	Butanol			Acétonitile			Méthanol		
	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN
BW1-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW1-2	+	-	-	+	-	+	+	-	+
BW2-2	+	-	-	+	-	-	+	+	-
BW3-5	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW4-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-

SN_T: surnagent témoin. (+) : présences de la zone

SV_T: solvant témoin. (-) : absence de la zone

SLV : les solvants

Résultats et discussion

Tableau VIII: Effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire de gélatinase.

solvant	Butanol			Acétonitile			Méthanol		
	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN
BW1-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW3-5	+	-	-	+	-	+	+	-	+

SN_T: surnagent témoin.

(+) : présence de la zone

SV_T: solvant témoin.

(-) : absence de la zone

SLV : les solvants

Tableau IX: Effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire de l'estérase (Tween 20).

SLV	Butanol			Acétonitile			Méthanol		
	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN
A9	+	-	-	+	-	+	+	-	-
BS3	+	-	-	+	-	-	+	-	-
SH	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW1-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW1-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BWI-2	+	-	-	+	-	-	+	-	+
BW2-2	+	-	-	+	-	+	+	-	-
BW3-5	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW4-5	+	-	-	+	-	-	+	-	-

SN_T: surnagent témoin.

(+) : présence de la zone

SV_T: solvant témoin.

(-) : absence de la zone

SLV : les solvants

Résultats et discussion

Tableau X: Effet de quelques solvants organique sur l'activité enzymatique extracellulaire de l'estérase (Tween 80).

SLV	Butanol			Acétonitile			Méthanol		
	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+ SN	SN _T	SV _T	SV+SN
A9	+	-	-	+	-	-	+	-	+
BS3	+	-	-	+	-	+	+	-	-
BW1-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW1-2	+	-	+	+	-	-	+	-	-
BW2-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW3-5	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BW4-5	+	-	-	+	-	-	+	-	+

SN_T : surnagent témoin.

(+) : présence de la zone.

SLV : les solvants

SV_T : solvant témoin.

(-) : absence de la zone.

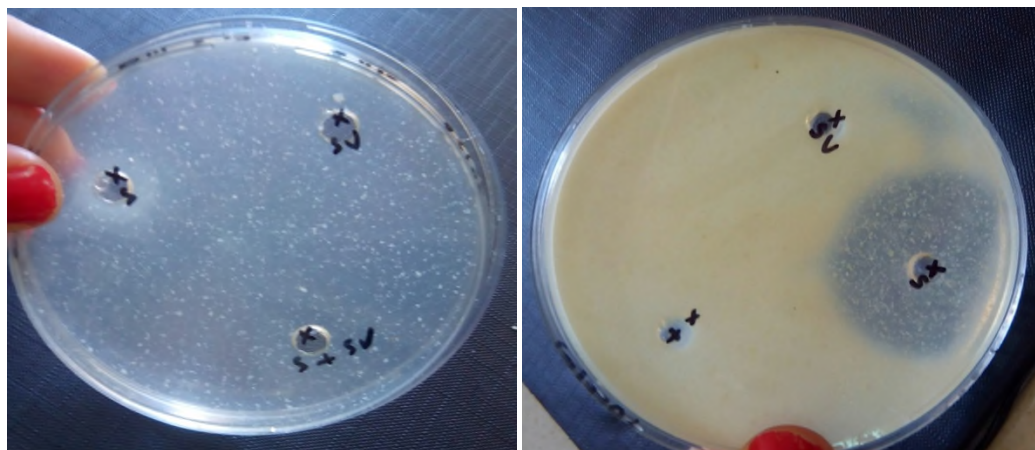


Figure N°12 : L'effet de Butanol sur l'activité enzymatique pour tween 20 (BW2-2) et d'Acétonitile sur gélatinase (BW1-2) respectivement.

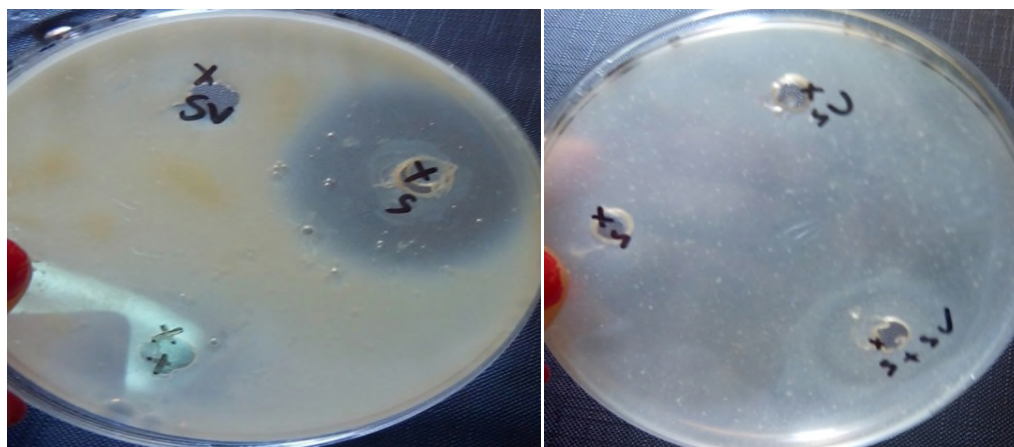


Figure N°13 : l'effet de méthanol sur gélatinase (BW1-2), et protéase (BS3) respectivement.

III -5- Discussion

L'étude réalisée sur des souches halophiles extrêmes locales isolées d'environnements hyper saline avait pour objectif la mise en évidence des activités hydrolytiques dans les surnageant de cultures de ces souches halophiles extrême. Les 9 souches forment des colonies pigmentées entre le jaune et l'orange en milieu solide. Elles présentent une pigmentation jaune à orange ou rose sur le milieu Br liquide, Ceci est dû à la production de caroténoïdes C40 et C50, comme le lycopène ou la bacterioruberine, protégeant les cellules contre les rayons UV et les dommages oxydatifs (**Mandelli et al., 2012**). Des concentrations élevées de KCl intracellulaire protègent également les cellules contre les dommages oxydatifs (**Mandelli et al., 2012; Shahmohammadi et al., 1998**). En combinaison avec différents mécanismes de réparation de l'ADN, par exemple les photolyases et le système de réparation UV (Uvr), il en résulte une forte résistance aux UV des microorganismes, ce qui est important dans leur habitat naturel marqué par une exposition intensive au soleil (**Baliga et al., 2004**).

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique des souches est très important, elles sont capables d'hydrolyser, l'amidon, le lait écrème, gélatne, tween20 et le tween 80. Toutes les souches obtenues sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ils sont dotés, principalement, d'une activité lipolytique, protéolytique et amylolytique. L'activité

Résultats et discussion

hydrolytique la plus abondante est celle de la dégradation de tween 20 et tween 80 (9 souches sur 9).

L'hydrolyse de tween 20 par les souches obtenues est la plus importante (toutes les souches), celle de la dégradation de l'huile d'olive est la plus faible (une seule souche). Il n'y a pas tant d'exemples d'estérases halophiles, particulièrement les lipases produites par des bactéries. L'activité lipolytique a été rapportée chez des souches de *Bacillus halodurans*, *Bacillus alcalophilus* et *Bacillus licheniformis* (Vargas et al., 2004). *Salinivibrio* SA-2, peut produire une lipase extracellulaire avec une activité optimale à une concentration de sel, de pH et de température de, 0.5M de NaCl, pH 7.5 et 50°C, respectivement (Amoozegar et al., 2008). Il y a aussi quelques études moléculaires sur la production des lipases halophiles. Par exemple, Une lipase et une protéine activatrice de lipase de *Vibrio vulnificus* CKM-1 ont été clonées et caractérisées (Su et al., 2004). Une enzyme lipolytique a été isolée de la bactérie halophile *Micrococcus lipolyticus*. De nombreux travaux ont permis d'isoler des souches halophiles d'environnements hypersalins peuvent hydrolyse de tween 80. Elles appartiennent aux genres *Salicola*, *Halomonas*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus* et *Salinicoccus*. Ces lipases sont actives en présence de fortes concentrations salines (Rohban et al., 2009).

En plus de l'activité lipolytique, 8 souches possèdent une activité protéolytique avec une préférence plus notable pour la dégradation de lait écrémé et de la gélatine. Des études portant sur les protéases d'halophiles extrêmes et modérés ont montré leur stabilité en présence de 3% à 25% (p/v) de NaCl, sur un intervalle de pH (5 à 10) et aux températures comprises entre 40 et 75°C (Ryu et al. 1994; Vidyasagar et al., 2006; 2009). Elles sont thermostables et stables à pH alcalin et en présence de fortes concentrations salines, ce qui fait d'elles des candidats idéaux pour différentes applications industrielles. Ces résultats sont en accord aussi avec l'étude de Taprig et al. (2013) dans laquelle 17 aliments salés fermentés (dont la majorité sont des poissons) ont fait l'objet d'un criblage et une caractérisation de bactéries halophiles productrices de protéases extracellulaires. Ces dernières ont été produites avec une grande quantité (3,51-3,62 unités/mg de protéine) par des bactéries appartenant principalement aux genres *Virgibacillus* et *Halobacillus*. D'autres études ont montré que les protéases issues des bactéries halophiles et halotolérantes présentent une activité optimale en présence de 3% à 25% de NaCl, un pH de 8 à 11 et à des températures comprises entre 40 et 60°C. À l'exception de *Virgibacillus* sp. SK33 qui produit une protéase avec un optimum de pH à 7,5. Indiquant que la majeure partie des protéases halo-bactérienne présente aussi des

Résultats et discussion

caractéristiques d'alcaliphilie. Ces propriétés rendent ces protéases appropriées pour être utilisées dans l'industrie des détergents (**Sinsuwan et al. 2009**).

Les productions de protéases halophiles recombinantes ont été aussi réalisées dans un nombre limité d'études. Le gène rapT a été cloné pour produire une protéase, et la structure tridimensionnelle d'une protéase alcaline extracellulaire résistante au dodécylsulfate de sodium (SDS) (vapT) de *Vibrio metschnikovii* souche RH530 a été caractérisée (**Kwon et al., 1995**). Récemment **Karan et al. (2012)** ont cloné et séquencé un gène d'une sérine protéase halophile isolée de *Geomicrobium* sp. EMB2.

L'activité amylolytique est aussi importante (6 souches). Les nombreuses études de caractérisation des amylases d'halophiles, ont montré que ces enzymes sont souvent stables et restent actives à des températures au-dessus de 50°C, sur un large intervalle de pH et aux fortes salinités (jusqu'à 30%, p/v) (**Prakash et al., 2009**). Elles pourraient donc être utilisées dans des processus durs d'industries de détergents et d'hydrolyse d'amidon (**Karan et al., 2012**). Le pH optimum de l'activité enzymatique varie de 6.5 à 7.5 avec quelques exceptions. Le pH optimum de *Salimicrobium halophilum* souche LY20, *Thalassobacillus* sp. LY18 et *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 apparaît à pH 9 et encore plus (**Prakash et al., 2009; Li et Yu 2011; 2012**). Par ailleurs, *Marinobacter* sp. EMB8 tolère jusqu'à un pH de 11 (**Chakraborty et al., 2009 ; Kumar et Khare, 2012**). La température optimale des amylases halophiles varie entre 45°C- 65°C. En revanche, *Marinobacter* sp. EMB8 présente une activité à 80°C, qui est une température relativement élevée pour des bactéries halophiles. Le poids moléculaire des amylases isolées de bactéries halophiles varie de 31 kDa pour *Thalassobacillus* sp. LY18 à 100 kDa pour *Nesterenkonia* sp. Souche F. Cependant le poids moléculaire du reste varie entre 50 kDa et 65 kDa. Les productions recombinantes d'amylases halophiles sont aussi réalisées. Le gène d'amylase, AmyA, de *Halothermothrix orenii* a été cloné, surexprimé et purifié. Les résultats ont montré que l'enzyme recombinante peut tolérer jusqu'à 25 % de NaCl, bien que l'optimum est observé à 5 % de NaCl (**Mijts et Patel, 2002**).

Des activités hydrolytiques combinées sont également observées chez la majorité des isolats, ce qui révèle un véritable atout biotechnologique. Il faut noter que cinq souches sont capables de produire quatre activités hydrolytiques différentes, six possèdent trois hydrolases et trois ont la capacité de produire quatre enzymes différentes. La présence de telle combinaison chez les halophiles a été rapportée par de nombreuses études réalisées sur de différents milieux salins et hypersalins (eaux, sols, aliments). Ces résultats sont en accords avec ceux de

Résultats et discussion

nombreux auteurs (**Sánchez-Porro et al., 2003; Moreno et al., 2007; Rohban et al., 2009 ; Taprig et al., 2013**).

Les enzymes thermostables présentent un intérêt particulier pour les applications industrielles en raison de leur stabilité à des températures élevées. Les protéases, les estérases et gélatinase halophile catalysent la réaction et maintiennent la stabilité à 25% d'NaCl. On sait que le sel améliore la thermostabilité des protéases alcalines (**Dodia et al., 2008a, b**). Après le traitement thermique de notre enzyme halophile à 70 ° C pendant 10 min la l'activité enzymatique est conservés pour les amylases et gélatinase. Ces résultats sont en accord avec l'étude des amylases bactériennes qui sont produites dans une large gamme de températures. Dans l'enquête actuelle, *Bacillus* sp. La souche PM1 était capable de produire de l'amylase dans une plage de température de 37°C à 70°C avec une production maximale à 50°C (3,07 U / ml). Cependant, la production d'enzymes a diminué avec l'augmentation de la température au-delà de 50 ° C. Environ trois fois l'augmentation du rendement en amylase a été observée à 50 ° C par rapport à 37 ° C, ce qui confirme le rôle majeur de la température dans la production d'amylase à partir de *Bacillus* sp. Souche PM1. De même, **Martins (2000) et Amoozegar (2003)** ont rapporté la température optimale de 50 ° C pour la production d'amylase de *Bacillus* sp. Et *Halobacillus* sp. Souche MA-2, respectivement. Les résultats de la température (37°C - 70°C) sont conformes aux résultats de Production d'amylase de divers *Bacillus* sp. Tels que *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus* sp.PN5 qui ont signalé produire de l'amylase à des températures de 37 à 70°C **Swain MR (2006) , Syu MJ (1997) et Saxena RK (2007)**. L'activité enzymatique était de 70% par rapport à l'activité enzymatique optimale à 50 ° C, ce qui indique la portée de l'activité amylase de 50 à 70 ° C. Les données suggèrent une moins grande sensibilité de l'enzyme à la température. Cette propriété encourage sa mise en application dans des processus nécessitant une inactivation complète de l'enzyme, comme dans le secteur bancaire **Coronado M (2000)**. Nos résultats sont conformes aux résultats de **Martins(2000) et de Amoozegar (2003)**, qui a rapporté 50°C pour être la température optimale pour l'activité amylase.

De nombreuses enzymes sont facilement dénaturées et inactivées en présence de solvants organiques. Par conséquent, l'ingénierie des protéines et plusieurs méthodes physiques et chimiques, telles que l'immobilisation, la modification et le piégeage des enzymes stabilisantes en présence de solvants organiques, ont été développées. Cependant, si les enzymes sont naturellement stables et présentent une activité significative en présence de solvants organiques, une telle activation et / ou stabilisation des enzymes n'est pas nécessaire.

Résultats et discussion

Nous avons émis l'hypothèse que les enzymes extracellulaires sécrétées par des microorganismes organiques tolérants aux solvants pour leur croissance sont stables en présence de solvants organiques. Sur la base de cette hypothèse, ils ont examiné des microorganismes organiques tolérants aux solvants qui produisent des enzymes hydrolytiques tels que les lipases, protéases. Notre résultats montre que 70% de l'activité résiduelle est conservée en présence de méthanol, acétonitile et disparaît complètement avec butanol. Les enzymes sont diverses dans leur sensibilité aux solvants.

Conclusion

Conclusion

Au terme de ce travail préliminaire qui consiste en le criblage de souches halophiles extrêmes potentiellement productrices d'enzymes, nous avons retenu :

Que les souches sont potentiellement productrices d'enzymes extracellulaires, d'intérêt biotechnologique.

L'activité enzymatique reste parfois accrochée aux cellules puisqu'elle n'est pas toujours retrouvée dans les surnageant de culture

Le traitement des surnageant présentant une activité enzymatique, à la chaleur d'une part, et aux solvants organiques d'autre part, a montré que ces enzymes sont généralement résistantes. Cependant, dans certains cas, seule une activité résiduelle persiste après ces traitements. Ces résultats ne sont cependant pas concluants.

Référence

Bibliographique

Références Bibliographiques

A

Amoozegar et al. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Microbiol Methods* 52: 353-359.

Amoozegar MA, Malekzadeh F, Malik KA. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *J Microbiol Methods*. 2003;52:353-359.

Amoozegar M.A., Schumann P., Hajighasemi M., Ashengroph M., Razavi M.R. (2008). *Salinicoccus iranensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 178–183.

Aygan A., Arikan B. (2008). A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake. *Int J Agric Biol* 10: 369-374.

Amoozegar , MA ., Salehghamari , E ., Khajeh , K . , Kabiri , M . , Naddaf , S. (2008). Production of an extracellular thermo halophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. *J. Basic Microbiol* 48 : 160–167 .

B

Briffotiaux J. (2008). Maintenance génomique chez l'archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* : découverte de nouvelles interactions physiques et caractérisation fonctionnelle. Thèse pour l'obtention du Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale en Microbiologie, Brest, France, 195p.

Baliga, N. S., Bjork, S. J., Bonneau, R., Pan, M., Iloanusi, C., Kottmann, M. C., . . . DiRuggiero, J. (2004). Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1. *Genome Res*, 14(6), 1025-1035.

Références Bibliographiques

Beldman G., Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and α -glucosidases. *Eur J Biochem* 146: 301-308.

C

Coronado M, Vargas C, Hofemeister J, Ventosa A, Nieto JJ. Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;183:67-71.

D

Das Sarma P., Coker J.A., Huse V., Dassarma S. (2010). Halophiles, industrial applications. *Encyclo Ind Biotechnol: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.* 1–43. detectable endoglucanases, exoglucanases and α -glucosidases. *Eur J Biochem* 146: 301-308.

D'Alessandro C.P., De Castro R.E., Giménez M.I., Paggi R.A. (2006). Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett Appl Microbiol* 44: 637–642.

Dodia MS, Bhimani HG, Rawal CM, Joshi RH, Singh SP (2008a) Salt dependent resistance against chemical denaturation of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Bioresour Technol* 99:6223–6227.

Dodia MS, Rawal CM, Bhimani HG, Joshi RH, Khare SK, Singh SP (2008b) Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:121–131.

F

Références Bibliographiques

Fukushima T., Mizuki T., Echigo A., Inoue A., Usami R. (2005). Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles* 9: 85–89.

G

Gonzalez C., Gutierrez C., Ramirez C. (1978). *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24: 710–715.

Guo B., Chen X.L., Sun C.Y., Zhou B.C., Zhang Y.Z. (2009). Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- β -xyylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 1107–1115.

Gulani , C., Bhattacharya , S. , Das , A. (2012) . Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian J Microbiol* ; 8(2): 116-122.

H

Hogg S, (2005), Essential Microbiology, John & Sons Ltd . Chichester , p454.

Hasper A.A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.J.I., De Graaff L.H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 1556-1560.

K

Kim, S.J., and Hoppe, H.G. (1986). Microbial extracellular enzyme detection on agar plates by means of methylumbelliferyl-substrates. In: GERBAMDeuxieme Colloque International de Bacteriologie Marine, Actes de Colloque. REMER, Brest. 175-181.

Kwon Y.T., Kim J.O., Moon S. Y., Yoo Y. D., Rho H. M. (1995). Cloning and characterization of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio metschnikovii* strain RH530. *Gene* 152 (1) : 59-63.

Références Bibliographiques

Karan R., Capes M.D., DasSarma S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat. Biosyst* 8: 1-15.

Karthikeyan, P., Bhat, S.G., and Chandrasekaran, M. (2013). Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon *Natrinema* sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. *S. J. Biol. Sci.* 2, 205-212.

Kushner D.J., (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria, In: Vreeland R.H., Hochstein L.I. (ed) *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton, CRC Press.

Karan R., Capes1 M.D, et DasSarma S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic Biosystems*, 8:1-4.

L

Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W.H., Pretorius I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol and Molecul Biol Rev* 66 (3): 506-577.

Lentzen G., Schwarz T. (2006). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 623–634.

Li X., Yu H.Y. (2011). Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *J Indust Microbiol Biotechnol* 38 (11): 1837-1843.

Li X., Yu H.Y. (2012). Purification and characterization of novel organic-solvent-tolerant α -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20. *FEMS Microbiol Lett* 329 (2): 204-211.

M

Références Bibliographiques

Mamo G., Thunnissen M., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2009). An alkaline active xylanase: Insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie* 91: 1187-1196.

Marty V. (2011). Préparée au sein de l'Institut de Biologie Structurale et de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant.

Mandelli, F., Miranda, V. S., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*, **28**(4), 1781-1790.

Mijts B.N., Patel B.K.C. (2002). Cloning, sequencing and expression of an α -amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiol* 148: 2343-2349.

Moreno M.L., Mellado E., Garcia M.T., Ventosa A. (2007). Diversity of extreme halophiles producing hydrolytic enzymes in hypersaline habitats. *Halophiles-2007 booklet*. 59–60.

O

Oren A. (2002a). Diversity of halophilic microorganisms: environments phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56-63.

Oren A. (2002b). Halophilic microorganisms and their environments. In: Seckbach J(ed) *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats*. Kluwer Academic, Dordrecht. P. 595.

Oren A., Ventosa A., Grant W. D. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order Halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol* 47: 233-238.

Oren, A. (2002a). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Botechnol* 28, 56-63.

Références Bibliographiques

Onishi , H ., Mori , T. Takeuchi , S. , Tani , K., Kobayashi, T. , Kamekura, M. (1983). Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp. production, purification and characteristics. *Appl environ microbiol.* 45:24–30.

Onishi, H. , Fuchi , H., Konomi , K., Hidaka , O. , Kamekura , M. (1980). Isolation and distribution of a variety of halophilic bacteria and their classification by saltresponse. *Agric biol chem.* 44:1253–1258.

P

Pathak, AP., Sardar, AG. (2012). Isolation and characterisation of carotenoids producing Haloarchaea from solar salterns of Mulund, Mumbai, India. *Int. J of natural products and resource.* 3 (4), 483-488.

Perez-Pomares , F., Bautista, V. , Ferrer , J., Pire , C. , Marhuenda-Egea, FC., Bonete , MJ. (2003). α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, *Extremophiles*, 7: 299–306.

Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 44: 210-215.

Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylase from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 44: 210-215.

Q

Quesada . E ., Bejar. V., Ferrer. M.R., Calvo. C., Llamas ., Martinez- checa. F., Arias.S., Ruiz-Garcia.C., Paez.R., Martinez- canovas.M.J., del Moral.A. (2004). Moderately

Références Bibliographiques

halophilic, exopolysaccharide producing bacteria. In: Ventosa A (ed) Halophilic Microorganisms. Springer-Verlag, Berlin, pp 285-295

R

Rodriguez-valera.F., Ruiz-Berraquero.F et cormenzana.R.A., (1980) .Short communication: isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with carbon sources. *Journal of general Microbiology*.119:535-538.

Rodriguez-Valera F. (1993). Introduction to saline environments. In: Vreeland R.H.,

Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A. (2009). Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Ind Microbiol Biotechnol* 36: 333-340.

Ryu K., Kim J., Dordick J.S. (1994). Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microb Technol* 16:266–275.

Roxana C., Simona M., Gabriela P., Lucia D., Kamekura M., Mădălin E. (2009). Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal 5: 4458-4466.

S

Sigurgísladóttir S., Konraosdóttir M., Jonsson A., Kristjánsson J.K., Matthiasson E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. Volume15, Number 4: 361-366.

Su J.H., Chang M.C., Lee Y.S., Tseng I.C., Chuang Y.C. (2004). Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1678 (1): 7-13.

Setati,(2010). Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol* 9 (11): 1555-1560.

Références Bibliographiques

Schaechter M. (2004). Consulting Editor: Joshua Lederberg, the Desk Encyclopedia of Microbiologie, Elsevier Academic Press Ltd, Amsterdam- Boston- Heidelberg- London- New York- Oxford-Paris- San Diego- San Francisco- Singapore – Sydney – Tokyo, 1115 pages.

Saha B.C., Freer S.N., Bothast R.J. (1994). Production, purification and proprieties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl Environ Microbiol* 60(10): 3774-3780.

Shiladitya DasSarma, Priya Arora,(2001). Halophiles University of Short communication: isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with carbon sources. *Journal of general Microbiology*.119:535-538.

Swain MR, Kar S, Padmaja G, Ray RC. Partial characterization and optimization of production of extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung micro flora. *Pol J Microbiol*. 2006;55:289-96.

Syu MJ, Chen YH. A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chem Eng J*. 1997;65:237–247.

Saxena RK, Dutt K, Agarwal L, Nayyar P. A highly thermo stable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Biores Technol*. 2007;98:260-265.

Shahmohammadi, H. R., Asgarani, E., Terato, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., . . . Ide, H. (1998). Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents. *J Radiat Res*, **39**(4), 251-262.

Références Bibliographiques

Swain MR, Kar S, Padmaja G, Ray RC. Partial characterization and optimization of production of extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung micro flora. *Pol J Microbiol.* 2006;55:289-96.

Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. (2009). Purification and characterization of a saltactivated and organic solvent- stable heterotrimer proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. *J agri food chem* 58(1): 248-256.

Sánchez-Porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Appl Microbiol* 94: 295-300.

T

Teodoro CED, Martins MLL(2000). Culture conditions for the production of thermo stable amylase by *Bacillus* sp. *Braz J Micrbiol.*;31:298-302.

Taprig T., Akaracharanya A., Sitdhipol J., Visessanguan W., Tanasupawat S. (2013).

Screening and characterization of protease-producing *Virgibacillus*, *Halobacillus* and *Oceanobacillus* strains from Thai fermented fish. *J Appl Pharm Sci* 3 (02), 25-30.

Taprig T., Akaracharanya A., Sitdhipol J., Visessanguan W., Tanasupawat S. (2013). Screening and characterization of protease-producing *Virgibacillus*, *Halobacillus* and *Oceanobacillus* strains from Thai fermented fish. *J Appl Pharm Sci* 3 (02), 25-30.

V

Vargas V.A., Delgado O.D., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2004). Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnol Lett* 26 (2): 81-86.

Références Bibliographiques

W

Wejse P.L., Ingvorsen K., Mortensen K.K. (2003). Purification and characterization of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. *Extremophiles* 7: 423-431.

Wang C-Y., Ng C-C., Tzeng W-S., Shyu Y-T. (2009). *Marinobacter szutsaonensis* sp. Nov., isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2605–2609.

Y

Yang Y., Daniel T .Levick, and Caryn K. Just (2009). .Halophilic, thermophilic, and psychrophilic Archaea: Cellular and molecular Adaptation 19 *Journal of Young Investigators*

Annexes

Annexe I

Matériel

1) Appareillage

- Autoclave (PBI international)
- Bain- marie muni d'un agitateur rotatif (HMR-Lnv)
- Bain - marie
- Centrifuges (6000 rpm (HETTICH ,ZENTRIFUGEN.EBA20),14800rpm)
- Etuves (TORRE PICENARDCCR, CBM)
- Plaque chauffante et agitateur magnétique (TRADE RAYPA)
- Balance électronique
- Balance analytique de précision (Adventure TM)
- Vortex (VELP SCIENTIFICA)
- Micropipette (FORTUNA)
- Appareil photo de portable (SAMSUNG,G5)
- PH mètre
- Spatule, anse de platine

2) Réactifs

- Acétonitile (30%)
- Butanol (30%)
- Méthanol (30%)
- Lugol
- TCA (10%)
- TCA (35%)

Annexe II

Milieux de culture

Produit et solutions préparées

1) Produits

- Acide chlorhydrique (1N)
- Hydroxyde de sodium (1N)
- Amidon (1%)
- Lait écrème (10ml)
- Tween 20(1%)
- Tween 80(1%)
- Casein de Lait (1%)
- L'huile d'olive (2,5ml)
- Gélatine (0,8g)

2) solutions préparée

Solution

- TCA (10%)
- TCA (35%)
- **Milieu de culture liquide (g/l)**

Milieu Brown :

- ✓ Extrait de levure.....5g
- ✓ NaCl.....250g
- ✓ KCl.....2g
- ✓ MgSO₄.....20g
- ✓ Citrate tri -sodique.....3g
- ✓ Eau distillée.....1000ml

pH=7,2, autoclave à 121°C / 20min.

Milieux de culture solides (g/l)

Milieu Solide pour l'isolement et criblage des souches productrices des métabolites.

Milieu Brown :

- ✓ Extrait de levure.....5g
- ✓ NaCl.....250g
- ✓ KCl.....2g
- ✓ MgSO₄.....20g
- ✓ Citrate tri -sodique.....3g
- ✓ Agar.....20g
- ✓ Eau distillée.....1000ml

pH=7,2, autoclave à 121°C / 20min.

Milieu pour la recherche de l'amylase :

- ✓ Milieu Br.....100ml
- ✓ Amidon.....1g

pH=7,2, autoclave à 121°C / 20min.

Milieu pour la recherche de protéase :

- ✓ Milieu Br.....100ml
- ✓ Lait écrémé stérile.....10ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min.

N. B. La stérilisation des deux préparations se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation les deux préparations sont mises en mélangées stérilement.

- ✓ Milieu Br100ml
 - ✓ Caséine de lait.....1g
- pH= 7,2, autoclave à 121°C/20min.

Milieu pour la recherche d'estérase et lipase :

- ✓ Milieu Br.....100ml
- ✓ L'huile d'olive.....2, 5ml

- ✓ Milieu Br.....100ml
- ✓ Tween 20.....1ml

- ✓ Milieu Br.....100ml
 - ✓ Tween 80.....1ml
- pH= 7,2, autoclave à 121°C/20min.

Milieu pour la recherche de gélatinase :

- ✓ Milieu Br.....100ml
 - ✓ Gélatinase.....0,8g
- pH= 7,2, autoclave à 121°C/20min.

Résumé

Les archées halophiles sont des microorganismes qui peuplent les milieux à forte concentration en chlorure de sodium. Ce sont des microorganismes qui présentent un intérêt biotechnologique certain puisqu'ils sont producteurs de métabolites tels que les enzymes.

Le but de la présente étude est de rechercher des souches d'archées locales productrices d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. L'étude de l'effet de la température et de certains solvants organiques sur les activités mises en évidence, a également été entreprise.

Mots clés : halophiles, archées, métabolites, enzymes extracellulaires

Abstract

The halophilic archaea are microorganisms, which populate media with a high concentration of sodium chloride. They are microorganisms, which are of certain biotechnological interest since they are producers of metabolites such as enzymes.

The aim of this study is to investigate local archaea strains producing extracellular hydrolytic enzymes. The study of the effect of temperature and certain organic solvents on the activities was also undertaken.

Keywords: Halophiles, archaea, metabolites, extracellular enzymes